Элиот, У. Элист, К. Джекс. – М.: Мир, 1991. – 543с.
9. СТО 00482861-0015-2002. Вакцина против парагриппа-3 инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота сухая культуральная ассоциированная.
10. ГОСТ Р 50779-42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта. – ИПК изд. стандартов, 1999.

Контактная информации об авторах для переписки
Е.В. Сусский – к.в.н., директор ФГУП «Армавирская биофабрика»
В.Т. Ночевный – д.б.н., профессор, В.Н.С. Саратовского НИВИ
В.И. Смоленский – д.б.н., профессор ФГБУ «ВГНКИ»;
Т.В. Ночевная, к.б.н., эксперт, ЗАО «Микроген»

УДК 615.371

Романенко О. А., Тимченко Л.Д., Заерко В.И.
(ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет» , ФГУП «Ставропольская биофабрика»)

ПРОБЛЕМЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕПТОСПИР И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Ключевые слова: лептоспиры, питательные среды, гидролизаты, стимуляторы роста микроорганизмов.

Лептоспиры хемоорганотрофные, строго аэробные микроорганизмы, культивируемые при температуре плюс 37…38°С, относятся к семейству Spirochaetaceae и роду Leptospira, традиционно являются труднокультивируемыми микроорганизмами, в связи с чем для их производственного культивирования необходимо наличие в питательной среде длинных цепей жирных кислот и витаминов: тиамин (В1), цианкобаламин (В12). Основным источником азота являются смеси аминокислот, отвечающие питательным потребностям лептоспир [2]. Оптимум рН среды для культивирования лептоспир составляет 7,0 …7,6.

Питательные среды для производственного культивирования лептоспир делятся на сывороточные, полусинтетические и синтетические. К сывороточным питательным средам относятся среда Уленгута, ВГНКИ, Ферворта-Вольфа и др. К полусинтетическим и синтетическим относятся среда Шенберга, Элингаузена, твин-альбуминовая среда, твин-альбуминсывороточная среда Эллиса, альбуминовая среда ГНКИ [4].

Однако, чаще всего в производственных условиях для культивирования лептоспир, благодаря высокой питательности, используются сывороточные среды, или среды в которых сыворотка является важным составным компонентом.

Существует несколько требований, учитываемых при изготовлении сывороточных питательных сред: стерильность, оптимальный показатель рН, содержание необходимых питательных веществ (источники азота, углеродного питания, ростовые вещества, минеральные элементы) и др. [6], а также минимальный уровень опалесценции, позволяющий четко контролировать интенсивность роста лептоспир.

При существующем разнообразии питательных сред для культивирования лептоспир, в состав которых входит сыворотка крови, для предприятий биологической промышленности, остается актуальной проблема достаточного накопления бактериальной массы, необходимого для производства вакцины против лептоспироза животных. По-нашему мнению, такая проблема может быть обусловлена рядом причин, в частности, нестабильностью сывороточного компонента среды, что обусловливает зачастую выраженную опалесценцию

уже при добавлении буфера или других ростовых компонентов. В таких случаях усложняется техника расчета количества буферного раствора, необходимого для установления кислотно-щелочного баланса, адекватного потребностям лептоспир, а после засева затрудняется процесс просмотра культуры в проходящем свете или может отмечаться агглютинация микроорганизмов, что мешает объективности оценки интенсивности их роста.

По нашему мнению существует несколько возможных способов решения проблемы накопления бакмассы лептоспир в производственном цикле:

1) полная замена питательной среды;

2) изменение состава питательной среды путем изменения процентного соотношения буферного раствора и сыворотки крови, с одновременным контролем pH среды и сохранением ее питательности;

3) поиск высококачественных стимуляторов роста лептоспир, совместимых с основными компонентами среды и с жизнедеятельностью лептоспир.

Однако, полная замена питательной среды, например на синтетическую, или замена отдельных ее компонентов, в условиях производства является сложным процессом, требующим изменения «Инструкции по приготовлению и контролю поливалентной вакцины «ВГНКИ» против лептоспироза животных».

Контроль над изменением процентного соотношения буферного раствора и сыворотки крови, с одновременным сохранением pH и питательности среды, занимает добавочное время, что создает дополнительные проблемы в процессе производства.

В связи с этим, наиболее оптимальным способом улучшения свойств среды, не требующим радикального изменения «Инструкции…», является добавление эффективных стимуляторов роста микроорганизмов, не противоречащих питательным потребностям лептоспир.

В отличие от питательных добавок стимуляторы вносятся в питательные среды в минимальных дозах, практически не меняя их состава.

В роли стимуляторов роста микробов могут выступать простые вещества – холин, ацетаты, олеиновая кислота, дикарбоновые кислоты [3]. Также встречаются сведения об использовании в качестве стимуляторов роста экстрактов, гидролизатов, благодаря наличию в них целого ряда питательных веществ одновременно[7].

Преимущество использования гидролизатов состоит в стерильности, прозрачности, обогащенности питательными веществами, присутствующими в легко усвояемой для микроорганизмов форме. При разработке гидролизатов, необходимо учитывать их соответствие определенным требованиям: изготовление из экологически чистых и безвредных ингредиентов с высоким содержанием биологически активных веществ на единицу объема, обладающих высокими стимулирующими свойствами по отношению к конкретному микроорганизму и не противоречащих его питательным потребностям [1,5].

Встречаются лишь отдельные сведения об использовании стимуляторов роста для лептоспир. Так, например, Панова Н. В., в своей работе, на тему: «Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере

некоторых вакцинных штаммов бактерий», указывает в качестве стимулятора роста лептоспир препарат «ЭСРМ» [8].

Несмотря на высокие показатели питательности, в литературе отсутствуют четкие сведения об использовании в качестве стимуляторов роста лептоспир гидролизатов, что требует более тщательного их изучения. В связи с вышеизложенным именно гидролизаты выбраны нами в качестве стимулятора при культивировании лептоспир в технологическом цикле изготовления вакцины поливалентной ВГНКИ против лептоспироза животных.

Для приготовления гидролизатов, с учетом питательных потребностей лептоспир были отобраны биологически активные субстанции животного, растительного и микробного происхождения, такие, как: эмбрионально-яичная масса куриного эмбриона, бананы, отруби, кормовые дрожжи, содержащие в своем составе витамины группы B, а также широкий набор аминокислот, что потенциально отвечает питательным потребностям лептоспир.

Из перечисленного сырья были приготовлены ферментативные гидролизаты, которые апробированы на базе предприятия ФГУП «Ставропольская биофабрика» в качестве стимуляторов роста штаммов Leptospira Pomona B2k6, L. Icterohaemorragiae B2k2, L. Tarassovi B2k4, входящих в состав вакцины поливалентной ВГНКИ против лептоспироза животных. Стимуляторы роста в концентрации 1% к общему объему добавляли к водно-сывороточной среде с содержанием альбу-

мина 0,22% (по 5 флаконов с каждым в десяти повторах).

Контролем посевов на всех указанных флаконах, служили посевы на эту среду без добавления стимулятора. Стимуляторы добавляли на этапе высева штаммов из пробирок во флаконы, вместимостью 200 см3 с питательной средой – 80-100 см3 и содержанием культуры 8-10 см3. Посевы инкубировали в течение 10 суток, при температуре 37-380С.

После 7 суток инкубации осуществляли промежуточный контроль роста лептоспир путем просмотра флаконов в проходящем свете. В норме, при легком встряхивании флакона появлялось помутнение среды в виде муаровых волн, что свидетельствовало о росте лептоспир, в присутствии опалесценции данный вид контроля роста оказывался невозможен.

Концентрацию лептоспир в культуре также определяли через 7 суток инкубации с помощью темнопольной микроскопии при увеличении 40x10, следующим методом. Испытуемую культуру разводили питательной средой 1:10 (к 1мл культуры добавляли 9мл среды). На предметное стекло наносили микропипеткой каплю культуры (0,02см3) и накрывали стандартным покровным стеклом. Капля должна заполнять все пространство под покровным стеклом, но не выступать из под него. Учет количества лептоспир проводили под микроскопом с бинокулярной насадкой. Подсчитывали количество лептоспир в 15 полях зрения по диагоналям препарата, после чего определяли среднее содержание в одном поле зрения с учетом сделанного разведения.

Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют, о том, что при культивировании лептоспир в питательной среде с добавлением всех стимуляторов роста, по сравнению с контролем отмечено накопление бактериальной массы микроорганизмов, всех штаммов входящих в состав вакцины. Наибольший прирост бактериальной массы лептоспир (в 2 раза выше по сравнению с контролем) зарегистрирован при использовании ферментативного гидролизата из бананов. При просмотре культуры лептоспир, выращенной на питательной среде с добавлением ферментативных гидролизатов из куриного эмбриона, кормовых дрожжей и отрубей, несмотря на их ростостимулирующие свойства, была четко выражена опалесценция, что затрудняло просмотр культуры лептоспир в проходящем свете.

Таблица 1

Ростостимулирующие качества водно-сывороточной среды с добавлением новых стимуляторов роста, n=50

Название стимулятора роста	Выраженность муаровых волн	Наличие опалесценции	Количество лептоспир штамма *Tarassovi* в 1 мл в млн/см^3	Количество лептоспир штамма *Icterohaemorragiae* в 1 мл в млн/см^3	Количество лептоспир штамма *Pomona* в 1 мл в млн/см^3
Ферментативный гидролизат из эмбрионально-яичной массы куриного эмбриона	слабо выражены	присутствует значительная опалесценция	66,6±0,21	68,5±0,24	69,3±1,09
Ферментативный гидролизат из бананов	ярко выражены	не опалесцирует	117,9±0,58	118,6±0,65	119,8±0,85
Ферментативный гидролизат из отрубей	умеренно выражены	присутствует значительная опалесценция	89±0,89	90,5±0,54	91,8±0,49
Ферментативный гидролизат из дрожжей	умеренно выражены	присутствует значительная опалесценция	88±0,59	89,2±0,46	90,5±0,65
Контроль, без стимулятора	умеренно выражены	не опалесцирует	59,1±0,56	60,5±0,56	61,9±0,88

(P<0,01) – достоверная разница в сравнении с контролем.

Учитывая все вышеперечисленное, мы

отказались от дальнейшего использования ферментативных гидролизатов из куриного эмбриона, дрожжей и отрубей, а, из бактериальной массы лептоспир, выращенной на питательной среде с добавлением ферментативного гидролизата из бананов, была выпущена экспериментальная серия вакцины поливалентной «ВГНКИ» против лептоспироза животных и контрольная серия без добавления стимулятора (рис.1).

Рис.1 Образцы контрольной (слева) и экспериментальной (справа) серий вакцины поливалентной ВГНКИ против лептоспироза животных

Обе серии прошли производственный контроль на стерильность, безвредность и активность, в соответствии с требованиями, изложенными в «Инструкции по приготовлению и контролю поливалентной вакцины «ВГНКИ» против лептоспироза животных» от 6 марта 1984 года. При этом установлено, что вакцина, изготовленная из бактериальной массы лептоспир, выращенной на питательной среде с добавлением ферментативного гидролизата из бананов не отличается по показателям стерильности, безвредности и активности от контрольной серии, которая полностью соответствует требованиям, изложенным в «Инструкции…».

Таким образом, подтверждена эффективность применения ферментативного гидролизата из бананов в качестве стимулятора роста лептоспир, что позволяет рекомендовать его применение в производстве вакцины против лептоспироза животных.

Резюме: В качестве стимуляторов роста лептоспир в производственных условиях испытаны ферментативные гидролизаты из куриного эмбриона, кормовых дрожжей, бананов и отрубей. Лучший эффект по накоплению бактериальной массы, при обеспечении стандартных требований к питательной среде, установлен при использовании ферментативного гидролизата из бананов. Из бактериальной массы лептоспир, полученной, на среде с добавлением этого гидролизата была выпущена экспериментальная серия вакцины поливалентной «ВГНКИ» против лептоспироза животных и контрольная серия, без добавления гидролизата. Обе серии прошли производственный контроль и полностью соответствуют требованиям, изложенным в «Инструкции по приготовлению и контролю поливалентной вакцины «ВГНКИ» против лептоспироза животных», в частности, по показателям безвредности, стерильности и активности.

SUMMARY
As a growth promoter of Leptospira in production conditions have tested enzymatic hydrolysates from chicken embryos, fodder yeast, bananas and bran. The best effect on accumulation of bacterial mass, showed enzymatic hydrolyzate of bananas, with providing standard requirements for medium. From the bacterial mass of Leptospira, obtained

on medium with the addition of this hydrolyzate, were released experimental series of polyvalent vaccine “VGNKI” against leptospirosis of animals and control series without adding of hydrolyzate. Both series have passed industrial inspection and completely correspond to the requirements stated in «Instructions on preparation and control of a polyvalent vaccine« VGNKI »against leptospira of animals», particularly, on indicators of harmlessness, sterility and activity.

Keywords: breed, ewe lamb, genotype, fattening and meat qualities, meatiness quotient, interieur indices.

Литература

1. Бабаян, Г.Л. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата. / Г.Л. Бабаян, В.К. Латов. - М.: Биотехнол. 2003. - № 6. - С. 47-51.

2. Геладзе, В.Ш. Изыскание универсальных питательных сред для культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов / В.Ш. Геладзе, Ситьков В.И., Заерко В.И.[и др.] // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. / Ставроп. ГСХА. – Ставрополь, 1998. – С. 30-31.

3. Иерусалимский, Н.Д. Основы физиологии микроорганизмов и клеток / Н.Д. Иерусалимский. – М.: Изд-во АМН СССР, 1963. – 263 с.

4. Малахов, Ю.А. Лептоспироз животных / Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева. – Ярославль: ДИА-пресс, 2000. – 584 с.

5. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: / Л.Я. Телишевская.- М., 2002.- 58 с.

6. Ткаченко, И.Н. Разработка и оценка качества новых питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов на основе активированных гидролизатов из молок лососевых рыб и вермикультуры: дис. …канд. биол. наук: / И.Н. Ткаченко. – Ставрополь, 2009. – 168 с.

7. Тутов, И.К. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов: Учеб. пособие для студ. высш. учебн. завед. по специальности 310800 «Ветеринария» / И.К. Тутов, В.И. Ситьков. - Ставрополь, 1997. – 253 с.

8. Панова Н. В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере

некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис. … канд. биол. наук: / Н. В. Панова. – Ставрополь, 2006. – 173 с.

Контактная информации об авторах для переписки

Романенко Ольга Александровна – аспирант кафедры ботаники, зоологии и общей биологии Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, младший научный сотрудник ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» E-mail: mora207@mail.ru

Тимченко Людмила Дмитриевна – профессор кафедры ботаники, зоологии и общей биологии Северо - Кавказского федерального университета, доктор ветеринарных наук.

Заерко Виктор Иванович – директор ФГУП «Ставропольская биофабрика».

ЮЖНО-РОССИЙСКИЙ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ
КОНГРЕСС

25-26 сентября 2014 г.
г.Ростов-на-Дону
www.vetcongress.org